



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

**Nanoencapsulação de Acetato de Eugenila via Polimerização Tiol-eno em
Miniemulsão e Avaliação da sua Ação Larvicida**

CAROLINE AGUIAR

Florianópolis – SC
2017

CAROLINE AGUIAR

**Nanoencapsulação de Acetato de Eugenila via Polimerização Tiol-eno em
Miniemulsão e Avaliação da sua Ação Larvicida**

Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo

Co-orientador: Me. Thiago Ouriques Machado

Florianópolis – SC
2017

Este trabalho é dedicado à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por todo o suporte que me deram, por terem sido meus primeiros professores e por estarem me apoiando neste momento. A minha família por me dar todo amor e carinho e por sempre me motivarem a não desistir dos meus sonhos.

Agradeço ao meu orientador Dr. Pedro por me dar o privilégio de trabalhar com ele desde a iniciação científica. Eu aprendi muito com você, obrigada pela confiança.

Ao meu co-orientador Thiago, que me deu todo o apoio e suporte para realizar este trabalho, obrigada por me ajudar neste momento.

À Juliana Zanatta que me ensinou e me deu suporte para os testes na biologia.

À Juliana Ribeiro que me deu suporte com o acetato de eugenila.

Aos colegas do LCP por todo o apoio.

Aos meus amigos da graduação que estiveram do meu lado em todos esses 6 anos e que me ajudaram muito a superar as dificuldades, em especial à Elisa, que mesmo nos momento mais estressantes estava ali para me acalmar.

Aos meus amigos da adolescência e que continuam até hoje. Laize, Francieli, Mariana, Leticia e Hiago, obrigada por todo amor e por estarem comigo todos esses anos.

Aos meus amigos do intercâmbio, obrigada por todo o suporte e amizade, que mesmo à distância, sempre foram presentes.

A todos, meu muito obrigada.

“Os sonhos não determinam o lugar em que você vai estar, mas produzem a força necessária para tirá-lo do lugar em que está”.

A. Cury

ABSTRACT

Several research are being directed towards green chemistry aiming to replace non-renewable technologies for those obtained from renewable resources. In polymer chemistry, this sustainable approach has led to the synthesis of novel monomers derived from renewable resources. Thio-ene polymerization has become increasingly important in the past few years as a promising technique for renewable monomers polymerization. Thiol-ene reaction are click reactions that can be performed under mild conditions with high yield and do not produce toxic sub-products. The aim of the present work is the *in situ* nanoencapsulation of eugenyl acetate (EA), an ester derived from clove oil, in poly (thioether-ester) (PTEE) through thiol-ene polymerization in miniemulsion and subsequent the larvicide activity of the formulations were evaluated. Stable lattices were obtained with average particle size of 200 nm and polydispersity < 0.2 measured by DLS. The ester eugenyl acetate was successfully encapsulated with efficiency up to 99.8%. GPC analyses revealed that the molecular weight is reduced by the presence of ester inside the particle in relation to the particles of pure polymer due to the reduction in thiol/ene groups conversion in reason of the antioxidant nature of eugenyl acetate. The nanocapsules of PTEE/EA presented molecular weight between 1.26 and 3.55 kDa. The melting temperature of samples containing EA, about 48°C, were measured through DSC and no phase separation between the polymer and the oil could be observed. Hence, the mixture oil/polymer presents reduced melting temperature in comparison to the pure polymer due the decrease in crystallinity of the polymeric. The larvicide assays of the PTEE/EA nanocapsules showed efficient activity for *Aedes spp* larvae, killing 100% of the larvae in 48 h.

Keywords: Thiol-ene polymerization; Eugenyl Acetate; Miniemulsion polymerization; Larvicide.

RESUMO

Muitas pesquisas estão sendo direcionadas para a abordagem da química verde em busca da substituição de tecnologias não-renováveis por aquelas obtidas a partir de fontes renováveis. Na química de polímeros esta abordagem sustentável tem levado à síntese de novos monômeros a partir de fontes renováveis. A polimerização tiol-eno tem crescido em importância nos últimos anos e se destacou com uma técnica promissora para a polimerização de monômeros a partir de fontes renováveis. As reações tiol-eno são conhecidas como reações *click*, reações que não formam subprodutos tóxicos, que podem ser realizadas sob condições brandas e que possuem alto rendimento. Este trabalho visa a nanoencapsulação do acetato de eugenila (AE), éster derivado do óleo de cravo, em poli (tio éter-éster) (PTEE) através da polimerização tiol-eno em miniemulsão e a avaliação da sua atividade larvicida. Obteve-se látices estáveis e com partículas com diâmetro médio de 200 nm com polidispersão $<0,2$, sendo o tipo de surfactante e o volume da fase aquosa os fatores que mais exercem influência sobre o tamanho final da partícula. O acetato de eugenila foi encapsulado com eficiência de até 99,8%. Análises de GPC revelam que a massa molar do polímero contendo acetato de eugenila é menor em relação ao polímero sintetizado na ausência do éster devido à redução da conversão dos grupos funcionais tiol/dieno acarretados pela natureza antioxidante do éster e também por este conter uma dupla ligação alílica que é passível de sofrer adição tiol-eno.. As nanocápsulas de PTEE foram obtidas com massa molar de 1,26 até 3,55 kDa. A temperatura de fusão das amostras poliméricas contendo acetato de eugenila, em torno de 48°C, foi medida através de DSC, e nota-se que não existe segregação de fase entre polímero e óleo que possa ser observada por calorimetria. Desta forma, a mistura óleo/polímero apresenta uma temperatura de fusão menor que o polímero puro decorrente da diminuição na cristalinidade da matriz polimérica. Realizou-se, também, a avaliação das nanocápsulas de PTEE carregadas com AE como agente larvicida, mostrando-se eficaz para a morte das larvas do mosquito *Aedes spp*, matando 100% das larvas em 48 h de teste.

Palavras chave: Polimerização tiol-eno; Acetato de Eugenila; polimerização em miniemulsão; Larvicida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese de acetato de eugenila por reação de acetilação do eugenol com anidrido acético..	25
Figura 2 - Polimerização: I) adição de um radical tiil através da ligação dupla. II) Transferência de cadeia de um radical carbono-centrado para um grupo tiol.	28
Figura 3 - Mecanismo de terminação da polimerização tiol-eno.	28
Figura 4 – Esquema de síntese das nanopartículas poliméricas.	32
Figura 5 – Nanopartículas de poli(tioéter-éster) carregadas com acetato de eugenila.	37
Figura 6 – Espectrofotômetro de FTIR para o polímero puro e as reações com maior e menor concentração de A.E, 04 - 5% e 03 - 25%.	38
Figura 7 – Espectrofotômetro de FTIR: aproximação nas bandas de 1600 cm^{-1}	39
Figura 8– As curvas apresentam a temperatura de fusão para três concentrações de A.E., 04 - 5%, 01 - 15% e 03 - 25%.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alimentos relatados com uso de acetato de eugenila.	25
Tabela 2 - Formulação das miniemulsões.	33
Tabela 3 - Tamanho de partícula (Dp) e índice de polidispersão (PDI) para as nanopartículas sintetizadas.	36
Tabela 4 – Eficiência de encapsulação para as miniemulsões 01 e 03.	37
Tabela 5 – Valores da massa molar obtidos para as diferentes concentrações de acetato de eugenila..	37
Tabela 6 – Mortalidade observada em 24 h de exposição à formulação 03.	40
Tabela 7 – Mortalidade observada em 48 h de exposição à formulação 03.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – Absorbância
A.E. – Acetato de Eugenila
AIBN – Azobisisobutironitrila
Bu(SH)₂ – 1,4-butanoditíol
DGU - 1-4-dianidro-D-glucitileno-diundec-10-etano
DLS – Dispersão de luz dinâmica
DSC – Calorimetria diferencial de varredura
FTIR – Espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier
GPC - Cromatografia de permeação em gel
Lut. – Lutensol
PDI – índice de polidispersão
PTEE – Poli (tioéter-éster)
TEM – Microscopia eletrônica de transmissão
THF - Tetrahidrofurano

LISTA DE SÍMBOLOS

D_p – Diâmetro de partícula [nm]
°C – Graus Celcius
% - Porcentagem
% m – Porcentagem em massa
mM – Mili molar
nm – Nanometro
C_{AE} – Concentração de acetato de eugenila
C_{AE0} – Concentração inicial de acetato de eugenila
EE – Eficiência de encapsulação
M_N – Numero médio da massa molecular [kDa]
M_w – Massa molecular média [kDa]
T_m – Temperatura de fusão [K]
LC₅₀ – Concentração letal

SUMÁRIO

1.	Introdução	23
1.1.	Objetivos	24
1.1.1.	Objetivo Geral	24
1.1.2.	Objetivos Específicos	24
2.	Revisão Bibliográfica	25
2.1.	Acetato de Eugenila	25
2.2.	Reações Tiol-Eno	26
2.3.	Polimerização via Tiol-Eno	27
2.3.1.	Degradação dos Polímeros de Tiol-Eno	29
2.4.	Nanopartículas Poliméricas	29
2.5.	<i>Aedes aegypti</i> : Breve histórico	30
2.5.1.	Inseticidas e a resistência do mosquito	31
2.6.	Considerações Finais	31
3.	Materiais e Métodos	32
3.1.	Materiais:	32
3.2.	Síntese das Nanopartículas Poliméricas:	32
3.3.	Tamanho de partícula	33
3.4.	Eficiência de encapsulação do Acetato de Eugenila	33
3.5.	Massa molar	33
3.6.	Composição Química	34
3.7.	Análise Térmica	34
3.8.	Morfologia das nanopartículas e nanocápsulas	34
3.9.	Teste Larvícida	34
4.	Resultados e Discussões	36
4.1.	Caracterização das nanocápsulas poliméricas	36
4.2.	Teste Larvícida	40
5.	Considerações Finais	42
5.1.	Conclusão	42
5.2.	Sugestões para trabalhos futuros	42
6.	Referências bibliográficas	43

1. Introdução

O esgotamento das reservas de combustíveis fósseis, aquecimento global e outros problemas ambientais é um dos maiores problemas a serem enfrentados pela humanidade nas próximas décadas, com isso em mente, muitos pesquisadores voltaram a sua atenção para a química verde. A procura por novas tecnologias sustentáveis durante as últimas décadas levou à síntese de novos polímeros, estes obtidos a partir de matérias-primas renováveis. Os ácidos graxos presentes nos óleos vegetais e açúcares de fonte vegetal destacam-se como matérias-primas vantajosas, pois ambos apresentam-se em grande disponibilidade, são de baixo custo, proporcionam uma grande diversidade estereoquímica e podem dar origem a materiais biodegradáveis (MEIER; METZGER; SCHUBERT, 2007; BELGACEM; GANDINI, 2008).

As reações de tiol-eno são consideradas reações *click* ou de química verde, pois são reações que podem ser realizadas em condições moderadas, alcançando, geralmente, alta conversão e não geram subprodutos tóxicos (HOYLE; LEE; ROPER, 2004; HOYLE; BOWMAN, 2010; CLAUDINO, 2011). Essas reações têm sido amplamente utilizadas para a polimerização de monômeros renováveis (KREYE; TÓTH; MEIER, 2011; TURUNÇ et al, 2012; KOLB; MEIER, 2013; TURUNÇ; MEIER, 2013; YOSHIMURA et al, 2015; MACHADO, 2015).

A polimerização tiol-eno possui um mecanismo a partir radicais livres que participam de reações em etapas, não em cadeia. A maior parte dos trabalhos encontrados na literatura retrata tiol-eno como polímeros reticulados, tais como hidrogéis e resinas, utilizados em diversas aplicações. Recentemente, polímeros tiol-eno lineares foram utilizados para sintetizar nano e micropartículas através de técnicas de polimerização heterogênea (DURHAM; SHIPP, 2014; JASINSKI et al, 2014; LOBRY et al, 2014; AMATO et al, 2015; MACHADO, 2015).

A polimerização tiol-eno tornou-se uma ferramenta versátil para a produção de polímeros a partir de monômeros α,ω -dienos inteiramente renováveis com grupos funcionais como éster, éter e amida na cadeia principal. Algumas dessas funcionalidades, como éster, são interessantes, pois podem ser prontamente hidrolisadas e, portanto, são potencialmente biodegradáveis (MACHADO 2015; MACHADO et al., 2016).

Desta maneira, os polímeros derivados de monômeros obtidos de matérias-primas renováveis, tornaram-se uma alternativa ecologicamente promissora, principalmente para aplicações biomédicas, quando este material for biocompatível ou biodegradável (ou mesmo ambos). Pode-se também afirmar que a polimerização tiol-eno em miniemulsão é uma das técnicas mais eficientes para sintetizar nanopartículas, nanocápsulas e partículas híbridas a partir de monômeros inteiramente renováveis.

Sob esse contexto, será utilizada a técnica de polimerização tiol-eno em miniemulsão para encapsulação *in situ* do acetato de eugenila, éster com propriedades antimicrobianas e larvicida obtido a partir do eugenol, que é o composto majoritário no óleo de cravo-da-índia. A nanoencapsulação do acetato de eugenila prolonga a atividade deste éster devido à lenta liberação do composto ativo proporcionada pelo sistema e este por ser aplicado a diversos substratos.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo Geral

Obter nanopartículas de poli (tioéter-éster) carregadas com acetato de eugenila através da polimerização tiol-eno em miniemulsão e avaliação da atividade larvícida do látex polimérico carregado com o éster.

1.1.2. Objetivos Específicos

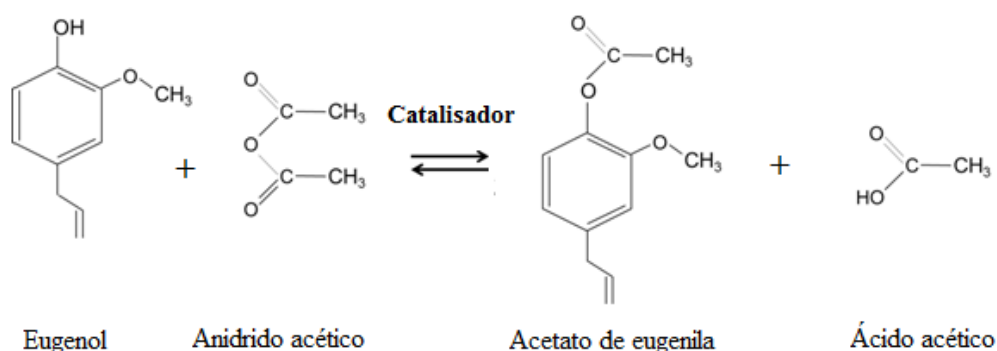
- ◆ Encapsulação do acetato de eugenila através da polimerização tiol-eno em miniemulsão;
- ◆ Caracterização das nanocápsulas poliméricas carregadas com o éster quanto ao diâmetro de partícula (DLS), massa molar (GPC), características térmicas (DSC); composição química (FTIR) e morfologia (TEM);
- ◆ Determinar a eficiência de encapsulação do acetato de eugenila através de espectrometria UV-Vis;
- ◆ Avaliar a atividade larvícida do acetato de eugenila encapsulado.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Acetato de Eugenila

O acetato de eugenila ($C_{12}H_{14}O_3$ 2-methoxy-4-prop-2-enylphenyl acetato) é um éster aromático com odor característico e semelhante ao óleo de cravo-da-índia. É encontrado em pequenas quantidades nos óleos essenciais de louro (*Laurus nobilis*), cravo-da-índia, cássia (*Cassia fistula*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*). É um composto derivado do eugenol que pode ser obtido por catálise química ou enzimática, como mostrado na Figura 1. A síntese deste éster aromático, reação de acetilação do eugenol, ocorre entre o eugenol e um doador do grupamento acila, geralmente o anidrido acético, na presença de catalisador, gerando como produtos o acetato de eugenila e ácido acético. (BURDOCK, 2010).

Figura 1 - Síntese de acetato de eugenila por reação de acetilação do eugenol com anidrido acético.



Fonte: BURDOCK, 2010.

O composto produzido é líquido e possui uma coloração amarela pálida (PANDEY et al., 2013) considerado seguro para aplicação em alimentos pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization* (FAO/WHO) e *European Food Safety Authority* (EFSA), sendo a sua dose de consumo diário entre 1 e 5 mg/kg (EFSA, 2011). A Tabela 1 apresenta os alimentos relatados com uso de acetato de eugenila (BURDOCK, 2010). No Brasil a utilização deste composto é liberada, pois a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) segue a recomendação dos produtos aprovados por essas organizações internacionais (ANVISA, 2007).

Tabela 1 - Alimentos relatados com uso de acetato de eugenila.

Categoria de alimento	Usual (ppm)	Máximo (ppm)
Assados	15,98	19,00
Condimentos	10,00	20,00
Laticínios congelados	5,65	7,56
Gelatinas e pudins	5,82	7,78
Produtos cárneos	20,00	25,00
Bebidas não alcoólicas	1,88	2,83

Fonte: BURDOCK (2010).

Diversos estudos relataram que além da propriedade aromatizante, o acetato de eugenila apresenta outras propriedades de interesse industrial.

O acetato de eugenila é um fenilpropanóide que vem sendo estudado devido à propriedade antimicrobiana (CHIARADIA et al., 2012; SILVA et al., 2015) e medicinal (DE MORAIS et al., 2014; SHUKRI; MOHAMED; MUSTAPHA, 2010). Estudos mostraram que o eugenol junto com o acetato de eugenila possui a capacidade de reduzir a hiperglicemia em roedores. A suplementação de 100 mg de eugenol e acetato de eugenila por kg na dieta de roedores reduziu significativamente o aumento de açúcar no sangue, danos aos tecidos causados pela hiperglicemia e inibiu a formação de catarata. Demonstrando o efeito de proteção dos órgãos e tecidos em diabéticos, proporcionado pelos componentes do óleo de cravo-da-índia (SHUKRI; MOHAMED; MUSTAPHA, 2010).

Estudos quanto ao efeito antimicrobiano do acetato de eugenila empregando a técnica de halo de inibição foi realizado por Silva et al. (2015) e Chiaradia et al. (2012). Silva et al., (2015) utilizou 12 tipos de bactérias, algumas patogênicas. Foram testadas bactérias Gram positivas *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans* e Gram negativas *Aeromonas sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, and *Salmonella choleraesuis*. O volume de 20 µL de acetato de eugenila apresentou o valor máximo de 16,62 mm e 17,55 mm de halo de inibição para bactérias Gram positivas e Gram negativas, respectivamente. Chiaradia et al., (2012) também avaliou o efeito antimicrobiano do éster com o mesmo volume frente a 16 bactérias. Sendo as Gram positivas *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Sarcina sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans* e Gram negativas *Acinetobacter sp.*, *Aeromonas sp.*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Serratia marcescens*, *Xanthomonas campestris* e *Yersinia enterocolitica*. O maior halo de inibição foi a bactéria *Acinetobacter sp.* 48,66 mm.

Um estudo mais recente tem vinculado os fenilpropanóides com ação larvicida contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*, o principal agente transmissor do vírus da Dengue, febre Chikungunya e Zika vírus (causador da microcefalia em recém-nascidos) no Brasil e vem preocupando as autoridades médico sanitárias de todo o mundo. Segundo o Ministério da Saúde, em 2015, foram registrados 1.649.008 casos de dengue no país (CAMPOS; ANDRADE, 2003; FURTADO et al., 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O efeito larvicida deste éster pode ser explicado devido à presença do anel aromático e uma cadeia lateral com uma ligação dupla alílica em sua estrutura o que o torna mais eficaz e mais reativo contra a parede celular da larva inibindo o desenvolvimento e o crescimento dos insetos (PANDEY et al., 2013). Desta forma, estudos verificaram que pequenas quantidades de acetato de eugenila são eficazes contra o desenvolvimento das lavras do mosquito *Aedes aegypti* (BARBOSA et al., 2012).

2.2. Reações Tiol-Eno

Reações tiol-eno são reações *click*, pois elas podem ser realizadas sob condições brandas de tempo e temperatura, proporcionando rendimento elevado e sem a formação de subprodutos tóxicos (HOYLE; LEE; ROPER, 2004; HOYLE; BOWMAN, 2010). Materiais poliméricos produzidos via polimerização tiol-eno apresentam características mecânicas superiores às de materiais semelhantes produzidos através da polimerização radicalar convencional, além de poder apresentarem uma estrutura de ligação cruzada única e degradabilidade aprimorada. Por exemplo, os polímeros de tiol-eno que contêm grupos funcionais hidrolisáveis, como grupos éster, têm sua biodegradabilidade facilitada, devido à presença do grupo sulfeto na cadeia polimérica. Além disso, muitos dos monômeros dieno utilizados na polimerização tiol-eno são derivados de matérias-primas renováveis (TURUNÇ,

MEIER, 2010,2013; FIRDAUS; MONTEIRO DE ESPINOSA; MEIER, 2011; WU et al, 2011; TURUC et al, 2012; VAN DEN BERG et al, 2013; MACHADO, 2015).

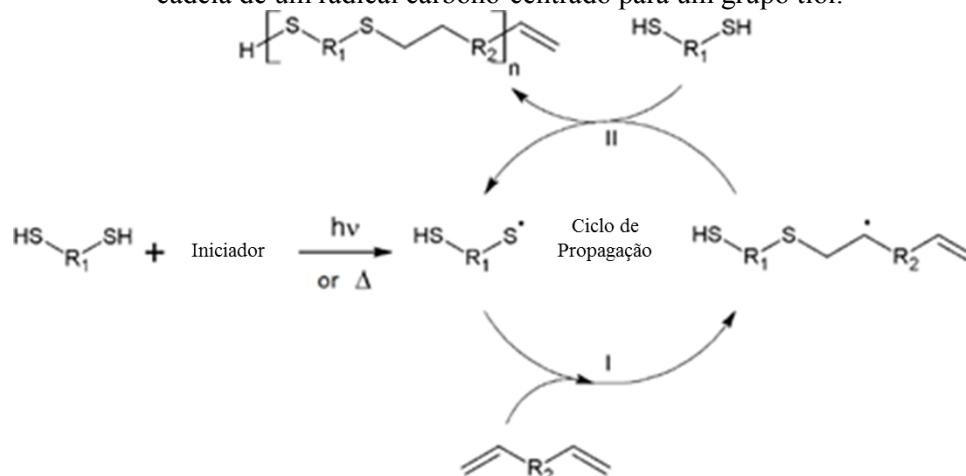
As reações tiol-eno têm sido amplamente utilizadas para funcionalização e conjugação de moléculas, revestimentos curáveis por UV e a polimerização de monômeros renováveis. Além disso, alguns estudos relataram um conjunto de aplicações biomédicas para esses polímeros, como a preparação de nanopartículas e hidrogéis adequados para a distribuição de medicamentos, resinas para restauração dentária, entre outros (CARIOSCIA et al, 2005; LU et al, 2005; AIMETTI; MACHEN; ANSETH, 2009; ZOU et al, 2011; ROBERTS; BRYANT, 2013; STORHA; MUN; KHUTORYANSKY, 2013; HACHET et al, 2014; KI et al, 2014; YANG et al, 2014). No entanto, os polímeros tiol-eno sob a forma de biomateriais ainda é um campo pouco explorado (MACHADO et al., 2016).

2.3. Polimerização via Tiol-Eno

A polimerização tiol-eno segue, como uma polimerização por radical livre tradicional, três etapas principais: iniciação, propagação e terminação, mais uma etapa de transferência de cadeia. Na etapa de transferência de cadeia, um radical carbônico transfere um elétron para o grupo tiol. Normalmente, utiliza-se proporção 1:1 de tiol-eno para, desta forma, evitar reações secundárias.

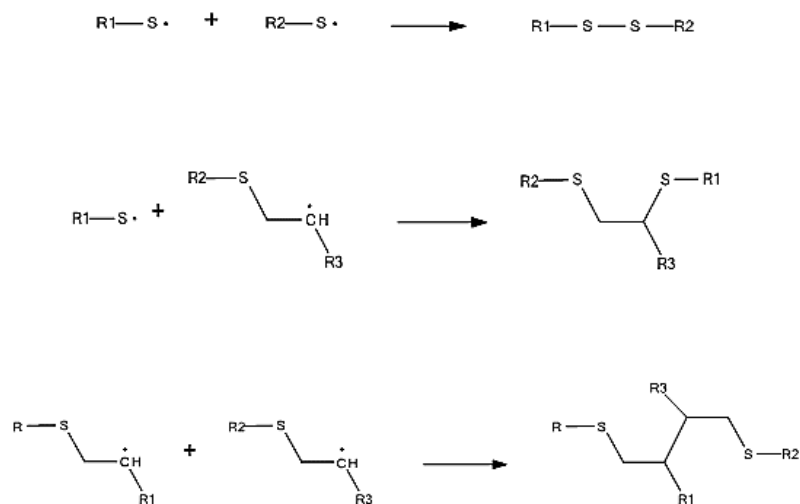
A figura 2 mostra um esquema simplificado da co-polimerização tiol-eno. Primeiramente, um radical é gerado pelo iniciador e transferido para o tiol, gerando radicais tiil através da abstração de um hidrogênio. Posteriormente, o radical tiil ataca a dupla ligação e se adiciona à olefina formando uma ligação tioéter e gerando um radical carbônico. Finalmente, ocorre a transferência de cadeia e o elétron não emparelhado é transferido do carbono para outro grupo tiol que esteja disponível, seja ele de um monômero ou de uma cadeia polimérica em crescimento, e um novo radical tiil é gerado, reiniciando o ciclo. Desta forma, a polimerização tiol-eno gira em torno da adição do radical tiil aos grupos funcionais eno (propagação) e da etapa de transferência de cadeia (HOYLE; BOWMAN, 2010). As reações de terminação, que são menos frequentes que as de propagação e de transferência de cadeia, envolvem processos de acoplamento radical-radical, pela recombinação das espécies radicais (radicais tiil ou β -carbono) (CLAUDINO, 2011).

Figura 2 - Polimerização: I) adição de um radical tiil através da ligação dupla. II) Transferência de cadeia de um radical carbono-centrado para um grupo tiol.



Fonte: MACHADO, 2015.

Figura 3 - Mecanismo de terminação da polimerização tiol-eno.



Fonte: MACHADO, 2015.

Na reação tiol-eno ideal não existe propagação do radical carbônico, conhecida como homopolimerização, o elétron desemparelhado possuído pelo radical carbônico é sempre transferido para um grupo tiol. Normalmente, as conversões se aproximam de 100%, tendo a transferência de massa como principal limitante. A reação líquida é simplesmente a combinação dos grupos tíois e dos grupos eno, o que faz com que a estrutura molecular evolua de maneira idêntica a quaisquer outras reações de polimerização por etapas (HOYLE; BOWMAN, 2010). O dieno pode sofrer omopolimerização num sistema não-ideal pois depende da reatividade relativa de ambos os monômeros, ou seja, a homopolimerização ocorre quando a constante de velocidade de propagação (k_p) do monômero eno é significativamente mais elevada que a constante da taxa de cadeia (k_{ct}).

Diferentemente da polimerização por radicais livres tradicional, a presença de oxigênio tem efeito inibitório reduzido sobre a polimerização tiol-eno. Na presença de oxigênio, ocorrem reações de transferência de cadeia adicionais, onde o oxigênio é

incorporado nas cadeias poliméricas em crescimento, como um radical peróxi, que reage com o tiol para gerar um radical tiil (CRAME; BOWMAN, 2001).

2.3.1. Degradação dos Polímeros de Tiol-Eno

Na última década, iniciaram-se diversos trabalhos avaliando a degradação de polímeros sintetizados a partir das reações de adição tiol-eno. O grupo de pesquisas de Bowman tem se dedicado desde 2005 ao estudo da degradação de polímeros tioéter-éster e tiol-acrilatos. Em 2005, Reddy, Anseth & Bowman avaliaram a polimerização de hidrogéis tiol-acrilatos observando que devido à dupla ligação carbono dos grupos acrilato estas reações se processam de acordo com dois mecanismos de polimerização: em cadeia e em etapas. Comprovaram ainda que é possível obter polímeros com perfis de degradação específicos variando a estequiometria dos grupos tiol : acrilato, o que possibilita um controle cinético da reação de degradação, a qual ocorre pela fácil hidrólise do grupo éster presente na cadeia polimérica.

Em 2007, Rydhlom, Anseth & Bowman avaliaram a influência da distância entre os grupos sulfeto e o grupo funcional éster em acrilatos, concluindo que a diminuição do número de carbonos entre os grupos de 2 para 1 e o aumento do pH do meio de degradação de 7,8 para 8, levou a um aumento na taxa de hidrólise da ligação éster em 4 vezes.

Jasinski *et al.* (2016) reportaram a degradação de dois látices de poli(tioéter-éster) com 20% em massa de polisulfeto, oriundos da copolimerização do dialil ftalato com 2,2-(etileno dióxido) etanoditiol (EDDT), formando um polímero (P1) com grupo fenil e outro (P2) a partir da copolimerização do dialil adipato, com EDDT. A degradação foi estudada em ambiente oxidativo com solução de peróxido de hidrogênio (10% m.) e em solução de ácido clorídrico (pH 2), através de análises de espectrofotometria UV/Vis. Dependendo das condições oxidativas, poli(tioéteres) hidrofóbicos podem ser oxidados para sulfóxidos polares, conduzindo a uma maior solubilidade da cadeia polimérica em água e quando em contato com solventes hidrofílicos são capazes de se decompor sob stress oxidativo,. Ambos os meios de degradação se mostraram efetivos na degradação dos látices formados, sendo a hidrólise mais efetiva no caso do P1 e as condições oxidativas favoreceram a degradação do polímero P2, obtendo-se uma solução completamente transparente em um dia de ensaio.

Materiais poliméricos sintetizados via reações de polimerização tiol-eno mostraram boa degradabilidade decorrente da quebra gradual das ligações sob atividade biológica. Porém, polímeros de tiol-eno ainda necessitam ser estudados no que diz respeito à degradação e à biocompatibilidade.

2.4. Nanopartículas Poliméricas

Nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas utilizando uma variedade de materiais, como proteínas, polissacarídeos, e polímeros sintéticos. A escolha do polímero a ser utilizado é dependente das características finais desejadas, como a aplicação, o tamanho de partícula, distribuição do tamanho, do fármaco que se deseja encapsular, do grau de biodegradação e compatibilidade do polímero para com o fármaco (MAHAPATRO; SINGH, 2011).

Dependendo da maneira como são produzidas, o termo nanopartículas, pode designar segundo Landfester (2006) e Rezende *et al.*, (2003) nanoesferas e nanocápsulas as quais diferem entre si pela estrutura organizacional.

Nanoesferas são constituídas por uma matriz polimérica sólida, na qual o fármaco pode ficar retido na superfície ou encapsulado na partícula, não havendo núcleo oleoso. Por

outro lado as nanocápsulas são formadas por uma membrana polimérica que possui um núcleo de líquido, podendo este ser oleoso ou aquoso, onde o fármaco encontra-se uniformemente disperso ou ainda adsorvido na matriz polimérica. (LANDFESTER, 2006; MOHANRAJ; CHEN, 2006; RAO; GECKELER, 2011; PERES, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2015).

Dependendo da área de aplicação do polímero empregado e do fármaco que se deseja encapsular as propriedades físicas e químicas das nanopartículas podem ser otimizadas pela seleção do método e condições de preparação (MOHANRAJ; CHEN, 2006; RAO; GECKELER, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2015). Os métodos de preparo das NPs mais usuais são: 1) dispersão dos polímeros pré-formados, utilizado frequentemente na preparação de nanopartículas biodegradáveis nas técnicas de nanoprecipitação, emulsificação/evaporação de solvente, emulsificação/difusão do solvente, *salting out*; 2) polimerização dos monômeros, processo no qual os monômeros são polimerizados em meio heterogêneo para formação das nanopartículas poliméricas como na polimerização em emulsão, miniemulsão e microemulsão (MAHAPATRO; SINGH, 2011; RAO; GECKELER, 2011; PERES, 2012); 3) Coacervação ou gelificação iônica para polímeros hidrofílicos, método que envolve a mistura de duas fases líquidas (MOHANRAJ; CHEN, 2006; RAO; GECKELER, 2011). Recentes estudos têm focado na polimerização em miniemulsão via reações tiol-eno para formação de nanopartículas e hidrogéis como técnica robusta e versátil (REDDY; ANSETH; BOWMAN, 2005; JASINSKI *et al.*, 2014; MACHADO, 2015).

Neste trabalho, será abordada a técnica de polimerização tiol-eno em miniemulsão, a qual oferece vantagens: como a possibilidade de encapsulação de compostos em uma única etapa no locus da polimerização, além de apresentar fácil manipulação das propriedades, como tamanho de partícula e características de superfície, obtenção de morfologia definida e flexibilidade em relação à escolha da matriz polimérica.

2.5. *Aedes aegypti*: Breve histórico

A dengue é uma das doenças reemergentes mais graves no mundo. A doença se manifesta sob duas formas: a dengue clássica (“febre de dengue”) e a forma hemorrágica (“febre hemorrágica de dengue”, FHD). Desde os anos 70, a Organização Mundial de Saúde (OMS) vem trabalhando de forma ativa no desenvolvimento de estratégias de tratamento e no controle da doença.

A dengue é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* seu principal vetor. Ele é encontrado principalmente no meio urbano, colonizado em depósitos de armazenamento de água.

A reemergência de epidemias de dengue foram alguns dos maiores problemas de Saúde Pública da segunda metade do século XX. As mudanças demográficas do século e o intenso fluxo migratório rural-urbano, geraram um crescimento desordenado das cidades, com ausência de boas condições de saneamento básico, e como consequência, teve-se a proliferação do vetor. A distribuição da doença é mundial, mas envolve principalmente países tropicais e subtropicais.

No ano de 2003, foram notificados cerca de 483 mil casos de dengue nas Américas. No Brasil, a dengue apresenta um padrão sazonal, com maior incidência nos primeiros cinco meses do ano, período mais quente e úmido.

Discussões recentes sobre o controle da dengue apontam para a necessidade de maiores investimentos em metodologias adequadas para sensibilizar a população sobre a necessidade de mudanças de comportamento, que objetivem o controle do vetor, e no manejo ambiental, incluindo a ampliação do foco das ações de controle de vetores, para minimizar a utilização de inseticidas, garantindo maior sustentabilidade (BRAGA; VALLE, 2007).

2.5.1. Inseticidas e a resistência do mosquito

Na Saúde Pública, o controle de vetores tem o papel de prevenir a infecção mediante o bloqueio ou redução da transmissão. Para tal, é necessário que se conheça o hospedeiro humano, a doença, o vetor e o ambiente. O controle efetivo dos vetores não pode depender de um só método, ele deve dispor de várias alternativas, adequadas a realidade local, que permitam sua execução. De acordo com as condições ambientais e a dinâmica populacional do vetor, métodos apropriados que são selecionados, e as populações do vetor são mantidas em níveis que não causam danos à saúde.

O controle biológico de mosquitos inclui o uso de vários predadores, invertebrados aquáticos ou peixes, que se alimentam das larvas e pupas. Além do uso de patógenos, como fungos, e de parasitas, como os nematódeos.

Já o controle químico é realizado com o uso inseticidas, de origem orgânica ou inorgânica, e é uma das metodologias mais utilizadas. Os inseticidas têm sido bastante usados, tanto na agricultura e agropecuária quanto na área de Saúde Pública. Seu uso contínuo tem provocado o aparecimento de populações resistentes, ocasionando problemas para o controle de vetores. Nesse contexto, o monitoramento e o uso de substâncias com modos de ação diferentes dos inseticidas químicos convencionais têm se tornado grande foco de estudos (BRAGA; VALLE, 2007).

Deste modo, o presente trabalho visa o estudo de um novo composto biocida, biodegradável e não tóxico, podendo ser aplicado de várias formas na prevenção do mosquito.

2.6. Considerações Finais

Há muito tempo as indústrias farmacêuticas e químicas buscam novas alternativas para um dos maiores problemas da atualidade: as doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*. Baseado nisto, o presente trabalho apresenta uma nova alternativa para o problema, um novo composto com ação larvicida.

Poucos estudos foram realizados na área de encapsulação de ésteres, frente a sua eficiência de ação larvicida, e a polimerização tiol-eno em miniemulsão com incorporação de ésteres *in situ*. Os desafios estão relacionados à estrutura química e como isto afetará as taxas de polimerização e as propriedades das nanocápsulas.

Desta forma, o presente trabalho apresentará a caracterização das nanocápsulas carregadas com o acetato de eugenila e a avaliação da atividade larvicida das mesmas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais:

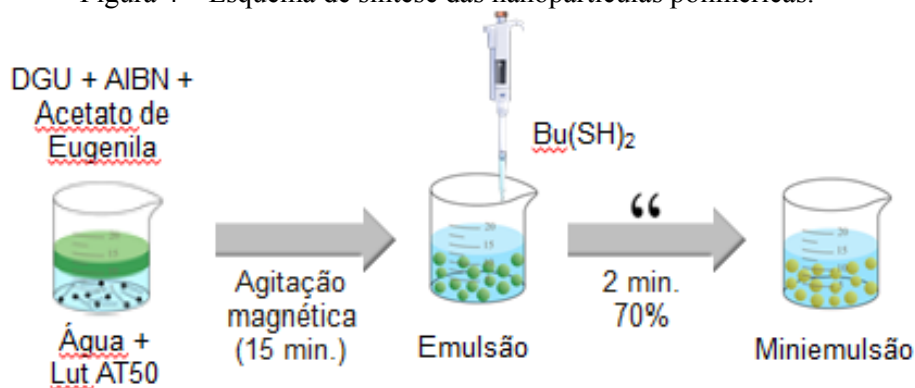
Para o preparo das miniemulsões foram utilizados os seguintes reagentes: água destilada; surfactante Lut AT50 (Lutensol AT50, BASF) que consiste em poli (óxido de etileno) éter hexadecil com 50 unidades de óxido de etileno; monômero 1-4-dianidro-D-glucitileno-diundec-10-etano (DGU, sintetizado segundo MACHADO, 2015); iniciador azobisisobutironitrila (AIBN, Vetec, 98%); 1,4-butanoditiol (BuSH_2 , Sigma-Aldrich 97%); éster acetato de eugenila (sintetizado segundo MACHADO, 2016). Todos os reagentes foram utilizados como recebidos, com exceção do AIBN que foi recristalizado.

3.2. Síntese das Nanopartículas Poliméricas:

As nanopartículas foram sintetizadas via polimerização tiol-eno em miniemulsão. O preparo foi realizado em duas fases distintas, uma fase aquosa e outra orgânica. Na fase aquosa misturou-se água destilada e o surfactante Lut. AT50, agitou-se até que todo o surfactante estivesse dissolvido na água. Já a fase orgânica foi preparada utilizando o monômero DGU, o iniciador AIBN e o acetato de eugenila, esta fase também foi colocada sob agitação, até que todo o iniciador estivesse dissolvido na fase. As duas fases foram misturadas e mantidas sob agitação magnética a 400 rpm por 15 minutos para formação da macroemulsão, em seguida, adicionou-se BuSH_2 e a agitação foi mantida a 250 rpm por mais 5 min.

Após a formação da macroemulsão na etapa anterior, a miniemulsão é obtida através da submissão da macroemulsão à alta energia. No estudo em questão, utilizou-se uma sonda ultrassônica modelo Fisher Scientific Sonic Dismembrator modelo 500, por 2 min a 70% de amplitude num regime de impulsos (10 s on, 5 s off). A Figura 4 representa um esquema simplificado do preparo da miniemulsão e a Tabela 2 apresenta as formulações. Após o preparo, o sistema foi colocado em um banho termostático a 80°C por 4 h.

Figura 4 – Esquema de síntese das nanopartículas poliméricas.



Fonte: Autor.

Tabela 2 - Formulação das miniemulsões.

Reagentes	Miniemulsões					
	EA01	EA02	EA03	EA04	EA05	EA06
DGU (g)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Acetato de Eugenila (g)	0,19	0,38	0,31	0,063	0,31	0,063
Bu(SH) ₂ (mL)	0,245	0,245	0,245	0,245	0,245	0,245
AIBN (g)	0,0034	0,0034	0,0034	0,0034	0,0034	0,0034
H ₂ O (g)	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
Lut AT50 (g)	0,24	0,24	0,37	0,12	0,12	0,37

3.3. Tamanho de partícula

O tamanho da partícula foi medido por dispersão de luz dinâmica (DLS), utilizando o equipamento Zetasizer Nano S da Malvern Instruments. Uma gota retirada da miniemulsão ou do látex foi colocada em uma cubeta de vidro e diluiu-se em água destilada antes da medição.

3.4. Eficiência de encapsulação do Acetato de Eugenila

A eficiência foi medida através da absorbância de luz incidente na faixa de 200-300 nm, utilizando o equipamento UV-VIS. Uma alíquota de cada miniemulsão foi centrifugada em amicon por 30 min a 13000 rpm, para separação do polímero da água. O filtrado foi recolhido e misturado com etanol numa solução 1:1, esta solução foi colocada em uma cubeta de quartzo, e assim realizou-se a medida de absorbância.

Os cálculos foram realizados utilizando a curva de calibração obtida no UV-VIS para o acetato de eugenila livre, representada pela Equação 1. Da curva, obtêm-se os valores da concentração do acetato de eugenila presentes na amostra a partir da absorbância lida no equipamento. Com o valor da concentração calculada, calcula-se a eficiência a partir da concentração inicial de acetato, como descrito pela Equação 2.

$$Abs = 0,014 \times C_{AE} + 0,0328 \quad (1)$$

$$EE = \frac{C_{AE0} - C_{AE}}{C_{AE0}} \times 100 \quad (2)$$

Onde Abs = absorbância lida no equipamento, C_{AE} = concentração de acetato de eugenila na amostra, C_{AE0} = concentração inicial de acetato na amostra e EE = eficiência de encapsulação.

3.5. Massa molar

A massa molar foi medida utilizando-se cromatografia de permeação em gel (GPC). Anteriormente à análises, há a necessidade de uma etapa de purificação para extrair o lutensol presente nas nanopartículas polimérica, a técnica consiste na precipitação do polímero a partir do látex por adição de metanol em banho de gelo, sob agitação. Em seguida a amostra foi filtrada e 0,05 g do polímero retido foi diluído em 4 mL de tetrahidrofurano (THF). A solução obtida foi filtrada em um filtro de seringa de nylon qual o diâmetro da malha do filtro?.

As distribuições de peso molar foram obtidas usando um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, modelo LC 20-A, Shimadzu) e colunas Shim Pack GPC800 Series (GPC 801, GPC 804 e GPC 807), também da Shimadzu. Utilizou-se THF como eluente. O sistema GPC foi calibrado utilizando padrões de poliestireno com peso molecular variando de 580 a $9,225 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$.

3.6. Composição Química

As amostras de polímero foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR) num espectrômetro Bruker, modelo TENSOR 27, na gama de números de onda $4000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$, acumulando 32 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} .

3.7. Análise Térmica

Amostras de polímero com pelo menos 5 mg foram submetidas a análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) usando um equipamento DSC 4000 Perkin Elmer, sob atmosfera inerte ($20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), de -20 a 120°C com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Os histórico térmico foi removido antes das análises por um ciclo de aquecimento/resfriamento, com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ e de resfriamento de $-20^\circ\text{C}/\text{min}$. As temperaturas de fusão foram obtidas a partir da segunda corrida de aquecimento.

3.8. Morfologia das nanopartículas e nanocápsulas

A caracterização morfológica das partículas fez-se através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) utilizando o JEM-1011 (100 kV). O látex sintetizado foi diluído, em água destilada, até 0,1% de sólidos. As análises foram realizadas no Laboratório Central na UFSC.

3.9. Teste Larvicida

Após caracterizar as nanocápsulas, escolheu-se a formulação que apresentou maior eficiência de encapsulação e maior estabilidade para o teste larvicida.

Para a realização do teste, utilizaram-se larvas do mosquito *Aedes albopictus*. Considerado um vetor secundário do vírus da dengue, o mosquito apresenta morfologia semelhante e a mesma capacidade de proliferação que o *Aedes aegypti*, sendo este motivo de preocupação nos países do continente asiático, já no Brasil não há registros de mosquitos adultos infectados com o vírus. Introduzido no Brasil na década de 80, o mosquito tornou-se alvo de estudos que monitoram o crescimento de sua população e investigam seus aspectos biológicos e ecológicos em comparação com o *A. aegypti*.

O teste seguiu a metodologia criada pela Organização Mundial da Saúde – WHO 2005, com algumas modificações. As larvas dos mosquitos foram expostas a várias concentrações do inseticida para testar a faixa de atividade do mesmo. Depois de determinar a mortalidade das larvas nas concentrações testadas, utilizou-se uma faixa mais estreita de concentração, entre os valores de 10% a 95% de mortalidade, em 24 ou 48 horas, para determinar LC_{50} . A LC_{50} representa a concentração letal, ou seja, a concentração de larvicida necessária para matar 50% dos indivíduos da população (WHO, 2005).

O teste foi preparado em um béquer que continha: 20 larvas, no 3º estágio de desenvolvimento; o látex, com concentração pré-determinada de 60 a 270 ppm; e preencheu-se com água destilada até o volume de 20 mL. Para cada concentração preparou-se em triplicata. Os béqueres foram colocados em uma caixa com tampa por 48 horas.

Realizou-se contagem da mortalidade das larvas em 24 horas e 48 horas de exposição.

Foram realizados testes de controle positivo e negativo. Os positivos continham as nanocápsulas de acetato de eugenila diluídas na água. Já os negativos foram preparados de duas formas: realizou-se um teste branco (nanocápsulas de referência, sem o acetato de eugenila); e outro sem a adição das nanocápsulas, tendo apenas água destilada e as larvas. Nos testes negativos não pode haver mortalidade. Se ocorrer a morte de mais do que 10% das larvas no controle negativo, o teste deveria ser descartado ou repetido. Se ocorrer morte no controle negativo entre 5% e 20%, os valores devem ser corrigidos de acordo com a fórmula de Abbott's, equação (1).

$$Mortalidade (\%) = \frac{X-Y}{X} \times 100 \quad (1)$$

Onde X corresponde a porcentagem de larvas vivas do controle negativo e Y corresponde a porcentagem de larvas vivas tratadas com as nanocápsulas.

A análise estatística foi realizada através do *software* BioStat Pro v. 5.9.8.

4. Resultados e Discussões

4.1. Caracterização das nanocápsulas poliméricas

As nanocápsulas de poli(tioéter-éster) foram preparadas via polimerização tiol-eno em miniemulsão, utilizando um monômero (DGU) derivado de fontes renováveis, sendo ainda carregadas com acetato de eugenila (A.E.). A Tabela 3 apresenta os tamanhos de partículas obtidos e a dispersão do DLS, todas as reações de polimerização apresentadas foram realizadas a 80°C por 4h utilizando 1 mol% do iniciador AIBN em relação ao ditiol, variando entre elas a concentração do acetato de eugenila e do surfactante, que foram respectivamente definidas como um percentual mássico relativo à quantidade total de monômeros (DGU + Bu(SH)₂) e em concentração molar em relação ao volume de água.

Tabela 3 - Tamanho de partícula (Dp) e índice de polidispersão (PDI) para as nanopartículas sintetizadas.

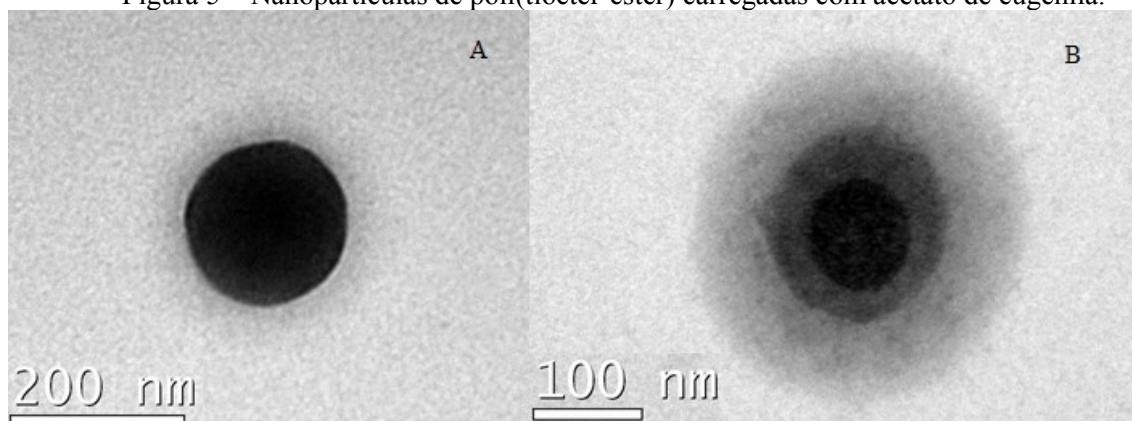
Reação	[A.E.] (% m)	[Lut. AT50] (x10 ⁻⁶ mM)	Dp (nm)	PDI
01	15	8	141,6	0,13
03	25	12	169,2	0,21
04	5	4	209,7	0,38
05	25	4	302,6	0,45
06	5	12	138,9	0,15

Diferentes tamanhos de partículas foram obtidos devido às diferentes concentrações de surfactante utilizado em cada reação, onde quanto maior a concentração do Lut. AT50 menor o tamanho de partícula obtido.

Os valores altos de PDI (> 0,2) são atribuídos a uma pequena população de macrogotas que pode ser associada a possíveis perturbações na sonicação durante o preparo da miniemulsão. Neste caso, deve-se considerar que parte do 1,4-butanoditiol gera espécies tiil durante a sonicação, uma vez formado o radical, a polimerização é iniciada antes do final da etapa de preparo da miniemulsão. Devido ao aumento da viscosidade, essa polimerização prematura pode afetar a eficiência de sonicação (MACHADO, 2015).

A Figura 5 exibe imagens de TEM para as nanopartículas sintetizadas. A Figura 5A e 5B mostram respectivamente nanopartícula de poli(tioéter-éster) e nanocápsula carregada com acetato de eugenila e estabilizadas com Lut. AT50. As partículas apresentaram morfologia esférica. Na Figura 5B é possível distinguir o acetato de eugenila presente dentro da cápsula (região mais escura no centro da nanocápsula) e ao em torno tem-se a casca polimérica.

Figura 5 – Nanopartículas de poli(tioéter-éster) carregadas com acetato de eugenila.



A Tabela 4 apresenta os valores obtidos para a eficiência de encapsulação do acetato de eugenila para os experimentos com concentração intermediária e com alta concentração do mesmo.

Tabela 4 – Eficiência de encapsulação para as miniemulsões 01 e 03.

Reação	[A.E.] (% m)	Abs	EE 1 dia (%)	EE 15 dias (%)
01	15	0,677	99,88	99,87
03	25	0,775	99,9	99,9

A partir dos valores apresentados na Tabela 4, percebe-se, que mesmo ao longo do tempo, as nanocápsulas continuaram estáveis e com eficiência alta de encapsulação (EE), acima de 99,8%. Este resultado era esperado, pois a polimerização em miniemulsão permite a formação de nanopartículas poliméricas estruturadas, em que o material encapsulado encontra-se no núcleo, protegido e estabilizado pela camada polimérica. (SAMYN et al., 2012).

As reações foram preparadas com diferentes concentrações de acetato como pode ser visto na tabela 5. Comparando-se os látices, pode-se perceber que a massa molar diminuiu consideravelmente de acordo com o aumento da concentração do acetato de eugenila, principalmente ao serem comparados com o polímero puro (Branco). Essa diminuição pode ser atribuída à presença do óleo na fase orgânica, pois os óleos que apresentam em suas cadeias ligações duplas que podem reagir com os radicais livres necessários para a polimerização, diminuindo a taxa de reação (GUO; SCHORK, 2008; HUDDA; TSAVALAS; SCHORK, 2005).

Tabela 5 – Valores da massa molar obtidos para as diferentes concentrações de acetato de eugenila.

Reação	[A.E.] (% m)	Dp (nm)	PDI	Mn (kDa)	Mw (kDa)	Mw/Mn
01	15	141,6	0,13	2,29	3,11	1,36
02	30	193,2	0,26	1,26	1,89	1,5
03	25	169,2	0,21	2,63	3,88	1,47
04	5	209,7	0,38	3,55	5,84	1,64
06	5	138,9	0,15	3,36	6,01	1,77
Branco	0	129,9	0,12	5,16	9,61	1,86

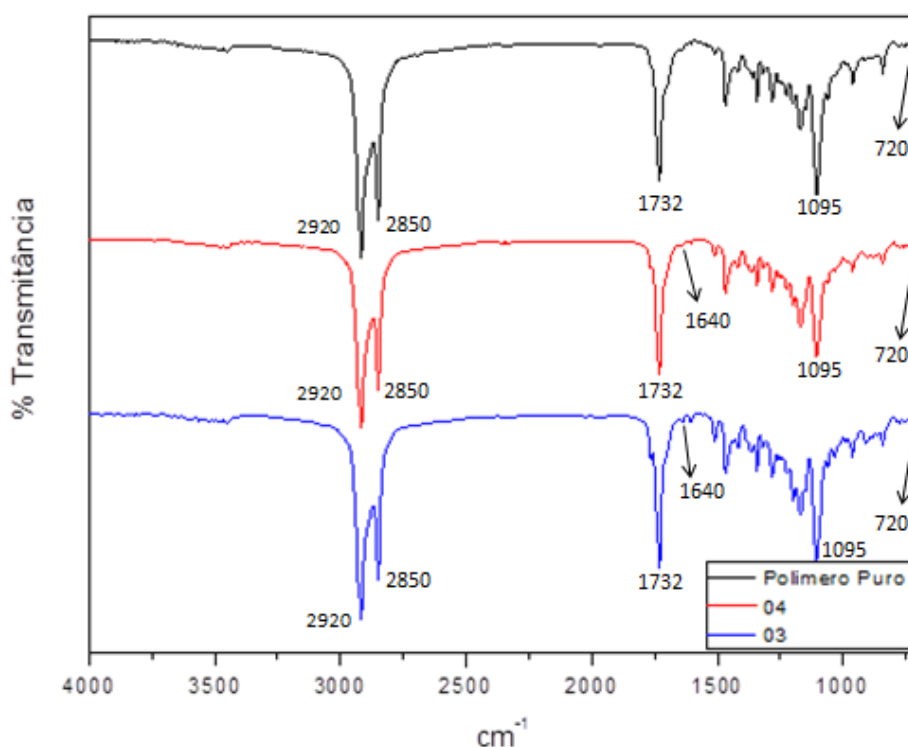
Essas reduções também podem ser atribuídas à distribuição dos grupos tiol, que reagem com as duplas ligações (DGU e A.E.) para a formação de polímeros, reduzindo assim a conversão do DGU. Neste caso, pode-se considerar que o acetato de eugenila é um agente

terminador de cadeia, pois ele reage com os radicais livres impedindo que a cadeia continue a se propagar (MACHADO, 2015; MENESES, 2016).

As nanocápsulas poliméricas vêm sendo utilizadas principalmente devido à vantagem de liberar o princípio ativo encapsulado por período de tempo prolongado. Quanto maior a massa molar da casca polimérica, maior a resistência à difusão do composto encapsulado para o meio externo, deste modo, quanto maior a massa molar do polímero obtido, mais lenta torna-se a liberação. Polímeros de massas molares reduzidas são preferidos quando a liberação do composto ativo não deve ser tão lenta.

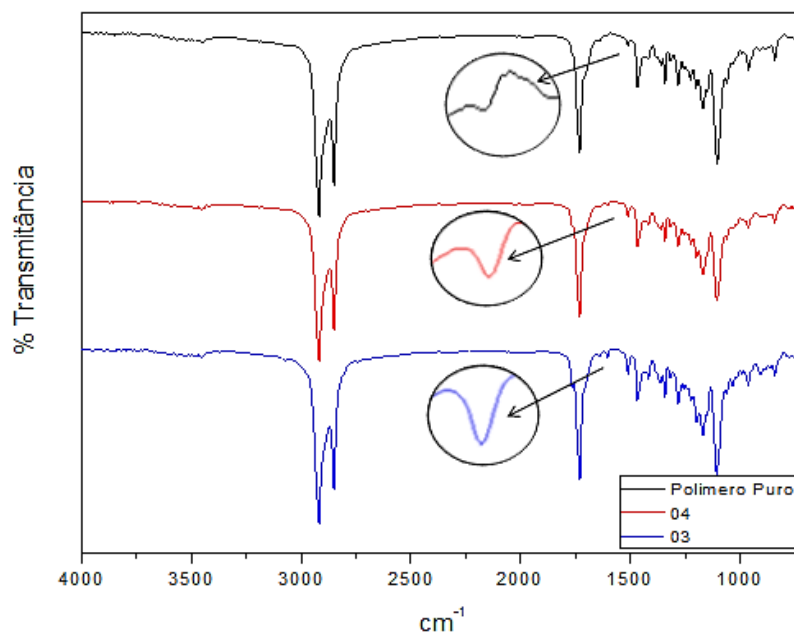
A Figura 6 apresenta o espectro de FT-IR das nanocápsulas de PTEE carregadas com A.E., onde é possível identificar os picos característicos das ligações presentes na cadeia polimérica. Na banda 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} estão presentes ligações do CH, correspondendo respectivamente a $-\text{CH}_3$ ligado a moléculas de oxigênio e a ligações $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2-$ nas formas alifáticas. Em 1732 cm^{-1} estão presentes ligações $-\text{C}=\text{O}$, características do monômero DGU e do acetato de eugenila. Em 1640 cm^{-1} encontra-se o pico de ligações $\text{C}=\text{C}$ presentes no polímero com o acetato de eugenila, pode-se perceber que este pico não aparece no espectro do PTEE puro. As ligações $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ presentes em éteres são vistas na banda de 1095 cm^{-1} .

Figura 6 – Espectrofotômetro de FTIR para o polímero puro e as reações com maior e menor concentração de A.E, 04 - 5% e 03 - 25%.



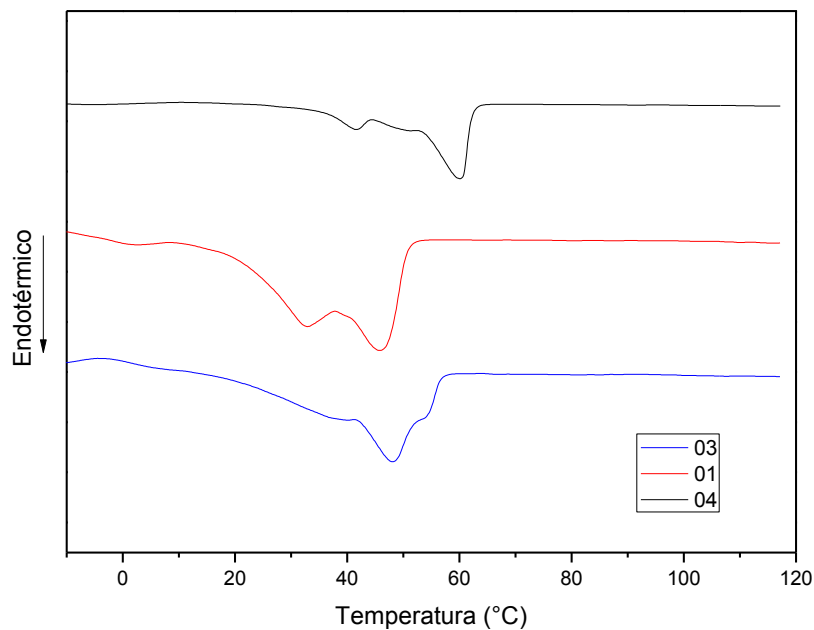
Em 910 cm^{-1} , tem-se um pico característico de ligações $\text{CH}=\text{CH}_2$ em compostos vinílicos. A banda de 720 cm^{-1} representa ligações do tipo S-C e são características da cadeia polimérica de PTEE, os picos relativos à ligação S-C apresentam menor intensidade nas formulações que contém A.E.. Na Figura 7, apresenta-se ampliado o pico em 1600 cm^{-1} presente nas amostras que contém A.E. o qual corresponde ao anel aromático presente na cadeia do acetato de eugenila.

Figura 7 – Espectrofotômetro de FTIR: aproximação nas bandas de 1600 cm^{-1} .



As curvas de aquecimento apresentadas na Figura 8 mostram um ombro à esquerda do pico de fusão, o que é característico de polímeros semi-cristalinos, onde ocorre fusão e recristalização parcial das cadeias poliméricas. O segundo pico apresenta uma temperatura de fusão mais elevada, correspondendo a uma estrutura cristalina mais perfeita (YU et al., 1983; YASUNIWA et al., 2004). A temperatura de fusão das amostras poliméricas contendo acetato de eugenila foi medida através de DSC, e nota-se que não existe segregação de fase entre polímero e óleo que possa ser observada por calorimetria, muito embora pode ter sido observada em TEM. A curva referente à amostra 04, com concentração de 5% de acetato de eugenila, apresenta T_m de 60,10 °C, sendo próxima à do polímero puro ($T_m = 62$ °C) (MACHADO, 2015), já as reações com concentração mais elevada do óleo (15-25%) apresentaram T_m mais baixas, em torno de 46 °C – 48 °C, este resultado pode ser explicado devido a parte do óleo penetrar na matriz polimérica e diminuir sua cristalinidade.

Figura 8– As curvas apresentam a temperatura de fusão para três concentrações de A.E., 04 - 5%, 01 - 15% e 03 - 25%.



4.2. Teste Larvicida

Para a realização do teste larvicida escolheu-se a amostra que continha maior concentração do acetato de eugenila, 03, com 0,3220 g (24,71 $\mu\text{g/mL}$) do composto. As Tabelas 6 e 7 apresentam a mortalidade observada no teste em triplicata.

Tabela 6 – Mortalidade observada em 24 h de exposição à formulação 03.

Leitura em 24h				
[03] (ppm)	Mortalidade 1	Mortalidade 2	Mortalidade 3	Mortalidade (%)
60	0	2	1	0
90	1	1	4	5
120	3	1	2	5
150	5	3	5	18
180	17	13	14	72
210	15	15	16	75
240	15	17	16	79
270	19	18	18	91

Tabela 7 – Mortalidade observada em 48 h de exposição à formulação 03.

Leitura em 48h				
[03] (ppm)	Mortalidade 1	Mortalidade 2	Mortalidade 3	Mortalidade (%)
60	11	11	10	42,86
90	13	13	14	59,18
120	14	14	15	65,31
150	20	18	19	93,88
180	20	20	19	97,96
210	19	20	20	97,96
240	20	20	20	100,00
270	20	20	20	100,00

A porcentagem de mortalidade foi corrigida utilizando-se a formula de Abbott's, esta correção foi necessária pois obteve-se porcentagem de morte no controle negativo entre 5% e 20%.

Após tempos de exposição às nanocápsulas carregadas com acetato de eugenila por 24 e 48 horas, fez-se a leitura de mortalidade das larvas e os valores obtidos foram analisados através de uma análise PROBIT no software BioStat. Esta análise fornece uma resposta do tipo “sim ou não”, que relaciona a taxa de mortalidade em função da concentração do composto ativo, neste caso, tem-se como resposta a LC_{50} e o desvio padrão.

A LC_{50} representa a concentração letal, ou seja, a concentração de composto ativo necessária para matar 50% dos indivíduos da população (WHO, 2005). A LC_{50} obtida em 24 h foi de 164,7 ppm com um desvio padrão percentual de 13,62% e a LC_{50} obtida em 48 h foi de 65,3 ppm com um desvio padrão percentual de 8,31%. A partir destes valores foi possível observar que o valor da LC_{50} em 48 h de exposição foi menor do que o obtido em 24 h de exposição, isto está associado à liberação do acetato de eugenila presente no interior das nanocápsulas, significando que de 24 h para 48 h a nanocápsula passou a liberar mais o princípio ativo, consequentemente aumentando a mortalidade. Sabe-se que quanto menor o valor da LC_{50} , mais eficiente é o larvicida, neste caso podemos considerar que as nanocapsulas de A.E. são eficientes como larvicida.

Para validação do teste e da ação larvicida do composto ativo deve-se observar os valores do desvio padrão, que devem ser menores que 25%(WHO, 2005). Os valores obtidos no teste estão de acordo com o valor estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO) em 24 e em 48 h de exposição das larvas frente às nanocápsulas carregadas com acetato de eugenila. A partir destes resultados obtidos, pode-se afirmar que as nanocápsulas de PTEE carregadas com acetato de eugenila possuem atividade larvicida..

5. Considerações Finais

5.1. Conclusão

Neste trabalho, foi relatada a síntese de nanopartículas poliméricas de PTEE e a encapsulação *in situ* do acetato de eugenila. O monômero DGU renovável foi copolimerizado com 1,4-butanoditiol ($\text{Bu}(\text{SH})_2$) através da polimerização tiol-eno em miniemulsão para produzir nanocápsulas de poli(tioéter-éster) contendo o éster acetato de etila. Foram avaliados principalmente a variação da concentração do A.E. e do surfactante.

A encapsulação do acetato de eugenila via polimerização tiol-eno em miniemulsão apresentou eficiência de até 99,8%. O polímero obtido a partir da polimerização em miniemulsão para encapsulação do éster *in situ* resultou em um massa molar mais baixa quando comparado às nanopartículas de polímero puro, esta diminuição na massa molar está associada principalmente ao óleo encapsulado, que captura os radicais livres devido sua ação antioxidante, além disso, devido à presença da dupla ligação vinílica, o A.E. age como um agente terminador de cadeia. As análises de microscopia mostraram que as nanocápsulas são de morfologia esférica. Com o DLS foi possível perceber que, de acordo com a concentração de surfactante, podem ser obtidas partículas de tamanhos de 140 até 300 nm.

A partir do DSC concluiu-se que as nanocápsulas sintetizadas eram semi-cristalinas, com T_m em torno de 48 °C, temperatura essa dependente da concentração de A.E. utilizada.

As nanocápsulas de acetato de eugenila foram bem sucedidas para o teste larvicida, evidenciando mortalidade alta em 48 h de exposição das larvas frente ao composto. Obteve-se LC_{50} de 65,3 ppm, com desvio padrão de 8,31%. Valores baixos da LC_{50} implicam no quanto as nanocápsulas são eficientes frente à mortalidade das larvas, quanto menor esse valor, maior é a taxa de mortalidade do composto larvicida. Deste modo, pode-se afirmar que as nanocápsulas de acetato de eugenila podem ser utilizadas como larvicidas.

A encapsulação do acetato de eugenila via polimerização tiol-eno em miniemulsão é uma alternativa viável e mais sustentável, visto ser um composto biodegradável, para o combate das larvas do mosquito *Aedes spp* e a substituição dos inseticidas comuns.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

- ◆ Encapsulação de outros compostos com ação larvicida e comparação dos resultados obtidos.
- ◆ Teste de repelência com as nanocápsulas de PTEE carregadas com acetato de eugenila.
- ◆ Impregnação do látex obtido em tecidos e avaliação da sua ação repelente.
- ◆ Impregnação do látex em tecidos para teste de oviposição.

6. Referências bibliográficas

- AIMETTI, A. A.; MACHEN, A. J.; ANSETH, K. S. Poly(ethylene glycol) hydrogels formed by thiol-ene photopolymerization for enzyme-responsive protein delivery. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 6048–6054, 2009.
- AMATO, D. V.; AMATO, D. N.; FLYNT, a. S.; PATTON, D. L. Functional, sub-100 nm polymer nanoparticles via thiol-ene miniemulsion photopolymerization. **Polymer Chemistry**, 2015.
- BARBOSA, J. D. et al. Structure-activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 68, n. 11, p. 1478–1483, 2012.
- BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. The State of the Art. In: Belgacem, M. N.; Gandini, A. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources, Oxford: Elsevier Ltda, p. 1-16, 2008.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, p. 113-118, 2007.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, p. 279-293, 2007.
- BURDOCK, G.A. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. 6^a ed., USA: Taylor and Francis Group, p. 681, 2010.
- CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. **Revista de Saude Publica**, v. 37, n. 4, p. 523–527, 2003.
- CARIOSCIA, J. A.; LU, H.; STANBURY, J. W.; BOWMAN, C. N. Thiol-ene oligomers as dental restorative materials. **Dental Materials**, v. 21, n. 12, p. 1137–1143, 2005.
- CHIARADIA, V. et al. Synthesis of Eugenol Esters by Lipase-Catalyzed Reaction in Solvent-Free System. 2012.
- CLAUDINO, M. **Thiol – ene coupling of renewable monomers : at the forefront of bio-based polymeric materials**. 2011. 63 p. Licentiate Thesis (degree of licentiate of Technology) - Kungliga Tekniska Högskolan, Stockholm, 2011.
- CRAMER, N. B.; BOWMAN, C. N. Kinetics of thiol-ene and thiol-acrylate photopolymerizations with real-time Fourier transform infrared. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 39, n. 19, p. 3311–3319, 2001.
- DE MORAIS, S. M. et al. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6250–6255, 2014.
- DURHAM, O. Z.; SHIPP, D. a. Suspension thiol-ene photopolymerization: Effect of stabilizing agents on particle size and stability. **Polymer**, v. 55, n. 7, p. 1674–1680, 2014.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on the safety and efficacy of allylhydroxybenzenes (chemical group 18) when used as flavourings for all animal species. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), **EFSA Journal**, Italy, v. 9, n° 12, 2011.

ESPINOSA, L. M.; MEIER, M. A. R. Plant oils: The perfect renewable resource for polymer science. *European Polymer Journal*, v. 47, p. 837–852, 2011.

FURTADO, R. F. et al. Atividade larvica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843–847, 2005.

GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V.; STEINMACHER, F. R.; PERES, L. B.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. Biodegradable Polymer Nanoparticles. In: **Biodegradable Polymer: New Biomaterial Advancement and Challenges**, cap. 3, p. 359–404, 2015.

GUO, J.; SCHORK, F. J. Hybrid Miniemulsion Polymerization of Acrylate/Oil and Acrylate/Fatty Acid Systems. **Macromol. React. Eng.**, v. 2, p. 265–276, 2008.

HACHET, E.; SERENI, N.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; RAVAINÉ, V.; SZARPAK-JANKOWSKA, A.; AUZÉLY-VELTY, R. Thiol-ene clickable hyaluronans: From macro-to nanogels. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 419, p. 52–55, 2014.

HOELSCHER, F. Degradação hidrolítica de filmes e nanopartículas de poli(tioéter-éster). Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

HOYLE, C. E.; BOWMAN, C. N.; Thiol-ene click chemistry; 2010.

HOYLE, C. E.; LEE, T. Y.; ROPER, T. Thiol-enes: Chemistry of the past with promise for the future. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 21, p. 5301–5338, 2004.

HUDDA, L.; TSAVALAS, J. G.; SCHORK, F. J. Simulation studies on the origin of the limiting conversion phenomenon in hybrid miniemulsion polymerization. **Polymer**, v. 46, p. 993–1001, 2005.

JASINSKI F.; LOBRY E.; TARABLSI B.; CHEMTOB A.; CROUTXE-BARGHORN C.; LE NOUEN D.; CRIQUI A. ; Light-Mediated Thiol-Ene Polymerization in Miniemulsion: A Fast Route to Semicrystalline Polysulfide Nanoparticles; 2014.

JASINSKI, F.; RANNÉE, A.; SCHWEITZER, J.; FISCHER, D.; LOBRY, E.; CROUTXÉ-BARGHORN, C.; SCHMUTZ, M.; LE NOUEN, D.; CRIQUI, A.; CHEMTOB, A. Thiol-Ene Linear Step-Growth Photopolymerization in Miniemulsion: Fast Rates, Redox-Responsive Particles, and Semicrystalline Films. **Macromolecules**, v. 49, n. 4, p. 1143–1153, 2016.

KI, C. S.; LIN, T.-Y.; KORC, M.; LIN, C.-C. Thiol-ene hydrogels as desmoplasia-mimetic matrices for modeling pancreatic cancer cell growth, invasion, and drug resistance. **Biomaterials**, v. 35, n. 36, p. 9668–9677, 2014.

KOLB, N.; MEIER, M. a R. Grafting onto a renewable unsaturated polyester via thiol-ene chemistry and cross-metathesis. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 843–852, 2013.

KREYE, O.; TÓTH, T.; MEIER, M. a R. Copolymers derived from rapeseed derivatives via ADMET and thiol-ene addition. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 9, p. 1804–1816, 2011.

LANDFESTER, K. Synthesis of Colloidal Particles in Miniemulsions. **Annual Review of Materials Research**, v. 36, n. 1, p. 231–279, ago. 2006.

LOBRY, E.; JASINSKI, F.; PENCONI, M.; CHEMTOB, A.; CROUTXÉ-BARGHORN, C.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M.; CRIQUI, A. Continuous-flow synthesis of polymer nanoparticles in a microreactor via miniemulsion photopolymerization. **RSC Advances**, v. 4, n. 82, p. 43756–43759, 2014.

MACHADO, J. R. Encapsulamento do éster acetato de eugenila obtido através de síntese enzimática. Qualificação de Doutorado em Engenharia de Alimentos. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

MACHADO, T. O. Synthesis of Poly(Thioether-ester) Nanoparticles Derived From Renewable Resources via Thiol-Ene Polymerization in Miniemulsion. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

MAHAPATRO, A.; SINGH, D. K. Biodegradable Nanoparticles are Excellent Vehicle for Site Directed in-vivo Delivery of Drugs and Vaccines. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 55, 2011.

MEIER, M. a R.; METZGER, J. O.; SCHUBERT, U. S. Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science. **Chemical Society reviews**, v. 36, n. 11, p. 1788–1802, 2007.

MENESES, A. C. Encapsulação de óleo de cravo em nanopartículas lipídicas e poliméricas em sistema livre de solvente. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. June, p. 561–573, 2006.

PANDEY, S. K. et al. Structure-activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 69, n. 11, p. 1235–1238, 2013.

PERES, L. B. Obtenção de Nanopartículas de PLLA e Nanopartículas Blenda PLLA/PMMA e PLLA/PS para Incorporação de um Análogo da isoniazida. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

PERIOTTO, D. Tabela de valores de absorção no espectro de infravermelho para compostos orgânicos. **UFSCar**, 2012.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, jul. 2011.

REDDY, S. K.; ANSETH, K. S.; BOWMAN, C. N. Modeling of Network Degradation in Mixed Step-Chain Growth Polymerizations. **Polymer**, v. 46, n. 12, p. 4212–4222, 2005.

REZENDE, S.; STANISÇUASKI, S.; LUCCA, L. De; RAFFIN, A. Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para a Administração de Fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

ROBERTS, J. J.; BRYANT, S. J. Comparison of photopolymerizable thiol-ene PEG and acrylate-based PEG hydrogels for cartilage development. **Biomaterials**, v. 34, n. 38, p. 9969–9979, 2013.

SAMYN, P.; SCHOUKENS, G.; STANSSENS, D.; VONCK, L.; ABBEELE, H. V. D. Incorporating different vegetable oils into an aqueous dispersion of hybrid organic nanoparticles. **J. Nanopart. Res.**, v.14, p.1075-1099, 2012.

SHUKRI, R.; MOHAMED, S.; MUSTAPHA, N. M. Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1116–1121, 2010.

SILVA, M. J. A. et al. Lipozyme TL IM as Catalyst for the Synthesis of Eugenyl Acetate in Solvent-Free Acetylation. 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds, 7^{ed}.

ŠTORHA, A.; MUN, E. a.; KHUTORYANSKIY, V. V. Synthesis of thiolated and acrylated nanoparticles using thiol-ene click chemistry: towards novel mucoadhesive materials for drug delivery. **RSC Advances**, v. 3, n. 30, p. 12275, 2013.

TÜRÜNÇ, O.; FIRDAUS, M.; KLEIN, G.; MEIER, M. a. R. Fatty acid derived renewable polyamides via thiol–ene additions. **Green Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 2577, 2012.

TÜRÜNÇ O.; MEIER M. a R.; The thiol-ene (click) reaction for the synthesis of plant oil derived polymers; 2012.

TÜRÜNÇ, O.; MEIER, M. A R. The thiol-ene (click) reaction for the synthesis of plant oil derived polymers. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 1, p. 41–54, 2013.

VAN DEN BERG, O.; DISPINAR, T.; HOMMEZ, B.; DU PREZ, F. E. Renewable sulfur-containing thermoplastics via AB-type thiol-ene polyaddition. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 804–812, 2013.

YANG, K.; HUANG, X.; ZHU, M.; XIE, L.; TANAKA, T.; JIANG, P. Combining RAFT polymerization and thiol-ene click reaction for core-shell structured polymer@BaTiO₃ nanodielectrics with high dielectric constant, low dielectric loss, and high energy storage capability. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 3, p. 1812–1822, 2014.

YASUNIWA, M.; TSUBAKIHARA, S.; SUGIMOTO, Y.; NAKAFUKU, C. Thermal analysis of the double-melting behavior of poly(L-lactic acid). **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 42, n. 1, p. 25–32, 2004.

YOSHIMURA, T.; SHIMASAKI, T.; TERAMOTO, N.; SHIBATA, M. Bio-based polymer networks by thiol–ene photopolymerizations of allyl-etherified eugenol derivatives. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 397–408, 2015.

YU, T.; BU, H.; HU, J.; ZHANG, W.; GU, Q. The double melting peaks of poly (ethylene terephthalate), **Polymer communications**, p. 83-91, 1983.

WHO; CDS; WHOPES; GCDPP. **Guidelines for Laboratory and Field Testing os Mosquito Larvicides**. 2005.

WU, J. F.; FERNANDO, S.; WEERASINGHE, D.; CHEN, Z.; WEBSTER, D. C. Synthesis of soybean oil-based thiol oligomers. **Chemistry & Sustainability, Energy & Materials**, v. 4, n. 8, p. 1135–1142, 2011.

ZOU, J.; HEW, C. C.; THEMISTOU, E.; LI, Y.; CHEN, C. K.; ALEXANDRIDIS, P.; CHENG, C. Clicking well-defined biodegradable nanoparticles and nanocapsules by UV-induced thiol-ene cross-linking in transparent miniemulsions. **Advanced Materials**, v. 23, n. 37, p. 4274–4277, 2011.